

RADIOCHEMISCHE
AKTIVITÄTSBESTIMMUNG
DER PHOSPHOLIPASE A₂ AM MODELL
VON NIERENMIKROSOMEN

Thomas Strasser

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0067

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. MED. E. BUCHBORN

RADIOCHEMISCHE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER PHOSPHOLIPASE A₂
AM MODELL VON NIERENMIKROSOMEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-
Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Strasser
aus Ottobeuren

Jahr 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. C. Weber
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Buchborn Prof. Dr. med. W. Forth
Dekan	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	3.3.1988

Inhaltsverzeichnis:

I.	EINLEITUNG	Seite	1
II.	STAND DER FORSCHUNG		4
2.1.	Rolle des Renin-Angiotensin-Systems		4
2.2.	Prostaglandine		4
2.3.	Wirkungen der Prostaglandine		6
2.3.1.	Vaskuläre Wirkungen		6
2.3.2.	Thromboregulation		7
2.3.3.	Renale Wirkungen		7
2.4.	Rolle der Phospholipase A_2 , Fragestellung		9
III.	MATERIAL UND METHODE		11
3.1.	Theoretische Beschreibung der an der Substratbiosynthese beteiligten Reaktionen		11
3.2.	Präparation von Rattenlebermikrosomen		13
3.3.	Praktisches Vorgehen		13
3.3.1.	Reaktionsansatz		13
3.3.2.	Inkubation, Extraktion		15
3.3.3.	Überprüfung der Reaktion mit Radiodünnschichtchromatographie		15
3.3.4.	Testung mit hochgereinigter Standardphospholipase A_2		17
3.4.	Kinetische Untersuchung mit Standardphospholipase A_2		20
3.5.	Versuchstiere		23
3.5.1.	Präparation		25
3.5.2.	Herstellung der Mikrosomen		26
3.6.	Spezifität der Methode		27

3.6.1.	Enzymkinetik im Bioassay	27
3.6.2.	Einfluß des pH-Wertes	28
3.6.3.	Calcium als Cofaktor der enzymatischen Reaktion	29
3.6.4.	Inhibierung durch Mepacrin/Indomethacin	30
3.6.5.	Acyltransferase - Gegenreaktion	32
IV.	RESULTATE	35
4.1.	Untersuchung der Aktivität der renalen Phospholipase A ₂ am Kaninchen unter normaler und hoher Kochsalzbelastung	35
4.2.	Untersuchung der Aktivität der renalen Phospholipase A ₂ am Kaninchen unter Glukocorticoideinfluß	38
V.	DISKUSSION	39
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	53

Verwendete Abkürzungen:

PC Phosphatidylcholin

PLA₂ Phospholipase A₂

PG Prostaglandin

C20:4 n-6 Arachidonsäure

Genetische Disposition



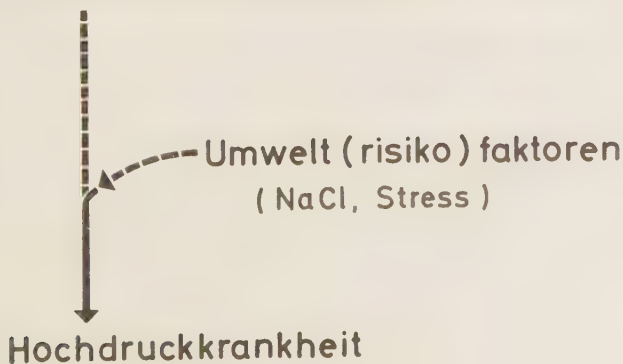
I. Einleitung

Entstehung der essentiellen Hypertonie

Für die Entstehung einer essentiellen Hypertonie werden mehrere Faktoren verantwortlich gemacht: hereditäre, umweltbedingte, zentralnervöse Einflüsse, organische Veränderungen an Nieren und Gefäßen und vieles andere mehr. Wird jedoch die "beginnende" essentielle Hypertonie betrachtet, so lassen sich keine spezifischen Faktoren im nervalen, endokrinen oder biochemischen Bereich finden, die auf eine spezifische Pathogenese hinweisen könnten.

Sicher scheint zu sein, daß eine genetische Prädisposition Voraussetzung zur Entwicklung der primären Hypertonie ist. Epidemiologische Studien bestätigen eine familiäre Häufung und eine Tendenz vergleichbarer Blutdruckwerte bei engen Verwandten (42). Diese Beobachtung prägt auch die heute akzeptierte Auffassung, daß die essentielle Hypertonie eine multifaktorielle Erkrankung im Sinne einer quantitativen Abweichung von der Norm darstellt, für deren Manifestation sowohl eine polygenetisch vererbte Disposition wie auch exogene Risikofaktoren nötig sind (41).

Genetische Disposition



Der Anstieg des Blutdruckes mit zunehmendem Lebensalter ist durch Umweltfaktoren bedingt (53). Von diesen Faktoren sind insbesondere Überernährung, Kochsalzaufnahme, sozialökonomische und psychosoziale Faktoren zu nennen. In den letzten Jahren wurde vor allem dem Einfluß der Kochsalzaufnahme große Aufmerksamkeit gewidmet. Überhöhte Kochsalzzufuhr (mehr als 5 g/Tag) wird als wichtiger permissiver Faktor für die Realisation einer genetischen Prädisposition für essentielle Hypertonie angesehen (5). Diese Auffassung stützt sich im wesentlichen auf das Fehlen der Hochdruckkrankheit bei wenig industrialisierten Völkern und auf epidemiologische Arbeiten, bei denen eine Korrelation zwischen Hypertonus und Kochsalzaufnahme nachgewiesen wurde (22,43). Allerdings liegt der Korrelationskoeffizient sehr niedrig, nur 10% der Blutdruckvariabilität sind durch Variation der Kochsalzaufnahme bedingt ($r=0,1$); es ist also keineswegs der Fall, daß eine gesteigerte Kochsalzaufnahme den Blutdruck generell erhöht. Es besteht aber die Möglichkeit, daß nur ein Teil der Bevölkerung sensibel auf erhöhte Kochsalzzufuhr reagiert, so daß bei undifferenzierten Untersuchungen ganzer Populationen keine signifikanten Korrelationen gefunden werden können (54). Die Untersuchungen von Kawasaki et al. lassen den Schluß zu, daß Patienten mit Hypertonie in zwei Gruppen, "salt sensitive" und "salt resistant", eingeteilt werden können (30). Die mit "salt sensitive" bezeichnete Gruppe schied unter hoher Kochsalzzufuhr deutlich weniger Salz aus und zeigte einen Blutdruckanstieg. Lever et al.

(35) stützten diese Hypothese durch ihre Resultate, daß bei hypertensiven Patienten während der Kochsalzaufnahme mehr Kochsalz gespeichert wird; diese Mehrspeicherung wird von einem Anstieg des Blutdrucks begleitet, der größer ist als bei normotensiven Patienten. Auch hier wurde der Schluß gezogen, daß die Sensibilität auf Kochsalzaufnahme bei verschiedenen Menschen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (gleiche Resultate bei 51 und 74).

Solche Untersuchungen führten zu dem Schluß, daß nicht alle Menschen auf hohe Kochsalzzufuhr gleich reagieren und ebenso nicht alle hypertensiven Menschen auf Kochsalzrestriktion (37). Der therapeutische Wert einer Kochsalzreduktion bei Hochdruck bleibt davon jedoch unberührt, da sich eine hohe Kochsalzaufnahme auf die Schwere des Hypertonus ungünstig auswirkt und die antihypertensive Wirkung der meisten Antihypertensiva verringert.



II. Stand der Forschung

2.1. Rolle des Renin-Angiotensin-Systems

Geht man von der Tatsache aus, daß die Kochsalzaufnahme eine bedeutende Rolle in der Ausbildung der essentiellen Hypertonie spielt, so muß auch das Reglersystem des Natriumhaushaltes, das Renin-Angiotensin-System, betroffen sein. Renin, ein Enzym, das in Epitheloidzellen der afferenten Arteriolen in der Nierenrinde gebildet, gespeichert und von dort freigesetzt wird, führt bei Einwirkung auf Angiotensinogen zur Bildung von Angiotensin I, ein Dekapeptid. Dieses Peptid wird durch ein vornehmlich in der Lunge, der Niere und in den Gefäßendothelzellen vorhandenes Enzym (converting enzyme) in Angiotensin II, ein Oktapeptid, überführt. Angiotensin II ist eine der blutdruckaktivsten bekannten Substanzen, es wird rasch durch Peptidasen inaktiviert und abgebaut. Groß et al. zeigten 1965 (25), daß Angiotensin II eine Stimulierung der Aldosteronbildung und damit eine Förderung der Natriumrückresorption in der Niere bewirkt. Es ist bekannt, daß das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System einen Regelkreis bildet, dessen Regelgröße der Natriumhaushalt darstellt. Die Reninaktivität ist dabei der Natriumzufuhr umgekehrt proportional: bei Salzzufuhr nehmen die Reninwerte auf ein Minimum ab, bei Salzrestriktion steigen sie deutlich an; ein Effekt, der durch Gabe eines Natriuretikums noch gesteigert werden kann.

2.2. Prostaglandine

Prostaglandine sind hochungesättigte, zyklische Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen, die aus Dihomo-gamma-linolensäure (C 20:3 n-6), Arachidonsäure (C 20:4 n-6) und Eikosapentaen-

säure (C 20:5 n-3) entstehen. Diese Fettsäuren werden entweder nutritiv zugeführt oder aus den essentiellen Fettsäuren Linol- bzw. Linolensäure synthetisiert. Die Struktur der Prostaglandine wurde 1963 durch Bergström und Samuelsson aufgeklärt; entsprechend den funktionellen Gruppen und der Lage der Doppelbindungen am Zyklopentanring werden sie in Gruppen von A - F eingeteilt, von denen A, B und C biologisch nicht vorkommen. In den letzten Jahren wurden zu den sogenannten klassischen PGs E_2 , D_2 und F_2 das bizyklische PG I_2 ("Prostazyklin") (44) sowie die Thromboxane, die anstelle eines Zyklopentanringes einen Oxanring enthalten, entdeckt (26).

Die Präkursorfettsäuren der Prostaglandinsynthese liegen in freier Form extra- wie intrazellulär nur in sehr geringen Konzentrationen vor (19). Nur freie Fettsäuren werden aber entsprechend dem Konzentrationsgradienten von Zellen aufgenommen und metabolisiert; Konzentration und Turnover der Präkursorfettsäuren unterliegen eigenen Regulationsmechanismen unabhängig vom gesamten Pool der freien Fettsäuren des Plasmas.

Die Masse der Präkursorfettsäuren liegt gebunden an die C_2 -Position von Phospholipidestern in Zellmembranen vor (7). Voraussetzung für die Prostglandinbiosynthese ist ihre Freisetzung, ein Schritt, der durch Phospholipasen katalysiert wird. Daraus ergibt sich, daß diesen Enzymen eine Schlüsselrolle der PG-synthese zukommt (32,67). Neben den membrangebundenen Phospholipasen kommen für die Stimulation der Fettsäurefreisetzung auch lysosomale Phospholipasen in

Frage (9,67). Die Weiterverstoffwechselung der so freigesetzten Fettsäuren erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen zu Prostaglandinderivaten oder zu Hydroxyfettsäuren und Leukotrienen.

Der Cyclooxygenase-Peroxidase-Prostaglandinsynthetase-Komplex bildet zunächst die zyklischen Prostaglandinendoperoxide PGG_2 und PGH_2 (27), zwei Sauerstoffmoleküle werden eingebaut, Sauerstoffträger wie Hämoglobin dienen als Aktivatoren dieses Schritts (12,15,16). Entscheidend ist die Bildung einer Endoperoxidverbindung durch Einbau eines Sauerstoffmoleküls zwischen C_9 und C_{11} der Präkursorfettsäure. Diese Endoperoxide sind biologisch hochaktive, instabile Substanzen mit sehr kurzer Halbwertszeit (27). Aus ihnen entstehen die weiteren Prostaglandine. PGE_2 und D_2 werden durch Einwirkung einer Isomerase, $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch eine Reduktase gebildet. Durch zwei weitere Enzyme entstehen PGI_2 (Prostazyklin) und TXA_2 (Thromboxan). Die Prostaglandine werden nach ihrer Synthese sofort freigesetzt und wirken an oder in unmittelbarer Nähe ihres Syntheseortes.

2.3. Wirkungen der Prostaglandine

2.3.1. Vaskuläre Wirkungen

Vaskulär haben die klassischen PGs je nach Spezies, Gefäßgebiet und PG-typ unterschiedliche Wirkung. Im allgemeinen sind PGs vom E, D und A-typ Vasodilatoren, vom Typ $\text{F}_{2\alpha}$ Vasokonstriktoren (39,63). PGI_2 wird vor allem in Gefäßwänden gebildet und wirkt stark vasodilatierend, TXA_2 wird vornehmlich in Thrombozyten synthetisiert und wirkt vasokonstriktorisch (45,26).

Tabelle 1: Gefäßwirkungen endogener Prostaglandine

		Vasodilatation	Vasokonstriktion
Arterien	allgemein	$\text{PGI}_2, \text{PGE}_2$	$\text{TXA}_2, (\text{PGF}_{2\alpha})$
	(u.a. Nieren-, Mesenterial- und Muskelarterien)	PGD_2	
	Coronararterien	PGI_2	$\text{TXA}_2, \text{PGF}_{2\alpha}$
	Pulmonalarterien	PGI_2	$\text{TXA}_2, \text{Endoperoxide}, \text{PGF}_{2\alpha}$
Venen		$\text{PGI}_2, \text{PGE}_2$	$\text{PGF}_{2\alpha}$

2.3.2. Thromboregulation

Thrombozytär gebildete PGs beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Förderung und Hemmung der Plättchenaggregation. Hier gebildetes TXA_2 wirkt aggregierend (26), vaskulär gebildetes PGI_2 antiaggregierend (44); wahrscheinlich ist PGI_2 für die seit langem bekannte antiadhäsive und antiaggregierende Wirkung des Gefäßendothels verantwortlich (45).

2.3.3. Renale Wirkungen

Sowohl in tubulären und vaskulären Strukturen als auch in interstitiellen Zellen konnte PG-synthetaseaktivität in Mark und Rinde nachgewiesen werden (14,17,60). Im Mark ist die Sytheserate hoch, der Metabolismus gering; umgekehrte Verhältnisse finden sich im Cortex (33). Das Spektrum der gebildeten PGs ist unterschiedlich. Diese innerhalb der Niere gebildeten PGs beeinflussen renale Hämodynamik, Reninfreisetzung sowie Wasser- und Elektrolytausscheidung (46,58,59).

Von besonderem Interesse sind die Interaktionen zwischen dem Renin-Angiotensin-System und der renalen Prostaglandinsynthese. Unter experimentellen Bedingungen, z.B. nach Zufuhr der Präkursorfettsäure oder Gabe eines Diuretikums und auch bei Zuständen, die mit einer Verminderung des renalen Perfusionsdruckes einhergehen, ist eine gesteigerte Prostaglandinsynthese beschrieben (50,70).

Es ließ sich auch zeigen, daß eine Stimulation der Prostaglandinsynthese die Reninfreisetzung um 100 bis 300% erhöht (70). Andererseits ist nach Gabe von Furosemid ein Anstieg freier Arachidonsäure im Plasma nachgewiesen (71), ein Hinweis dafür, daß Furosemid die Phospholipase A_2 direkt oder auf metabolischem Weg aktiviert. Nach Kochsalzentzug oder Diuretikagabe vermindert eine Blockierung der Prostaglandinsynthese die Reninsekretion, auch die basale Reninfreisetzung wird durch Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika supprimiert (69,70). Aufgrund dieser Befunde werden die Prostaglandine als wichtige Mediatoren für die Stimuli der Reninsekretion angesehen, wobei die Wirkungen der einzelnen Prostaglandine jedoch unterschiedlich sind: z.B. stimulieren Endoperoxide die Reninfreisetzung, $PGF_{2\alpha}$ wirkt inhibierend (69).

Diese unterschiedlichen Effekte sind wohl von prinzipieller Bedeutung für die Regulation der Kochsalz- und Wasserhomöostase und führten uns zur Frage einer direkten Aktivitätsbeeinflussung der renalen Phospholipase A_2 unter wechselnder Kochsalzbelastung.

2.4. Rolle der Phospholipase A₂, Fragestellung

Der Phospholipase A₂ kommt die Rolle des Schlüsselenzyms in der Prostaglandinsynthese zu. Diese Vorstellung beruht auf dem experimentellen Nachweis, daß keine Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandinen stattfindet, wenn die Präkursorfettsäure nicht vorher aus der Esterbindung der Phospholipide abgespalten wird (12), daß somit der Cyclooxygenase-Peroxidase-Prostaglandinsynthetase-Komplex in seiner Aktivität limitiert ist durch die Verfügbarkeit an freier Fettsäure.

Arachidonsäure ist in der Niere quantitativ die bedeutendste Präkursorfettsäure. Aus ihr entstehen die Prostaglandine der 2er-Serie. Ihre Freisetzung wird katalysiert durch die renale Phospholipase A₂. In anderen experimentellen Systemen, insbesondere in menschlichen Thrombozyten, sind weitere spezifische Lipasen beschrieben (4,32).

Aktivitätsbestimmungen der renalen Phospholipase A₂ wurden bisher mit mehreren experimentellen Ansätzen durchgeführt. So wurde eine stimulierende Wirkung von Calcium und Calciumionophor A23187, Angiotensin II, Bradykinin und Noradrenalin beschrieben (1,23,56), inhibierend wirken Mepacrin, Indomethazin, Kalium und Steroide (34). Insbesondere Dexamethason induziert die Neusynthese eines Proteins, das die Phospholipaseaktivität hemmt und die Prostaglandinbiosynthese supprimiert (18). Auch eine Selbstdeaktivierung des Prostaglandinsynthesekomplexes durch Produkte ist beschrieben (16). Als Parameter der enzymatischen Aktivität der Phospholipase A₂ dienten die meist radioimmunologisch bestimmten Endprodukte des Stoffwechselweges, die einzelnen Prostaglan-

dine. Eine isolierte Betrachtung und nähere Charakterisierung allein der Phospholipase A_2 erscheint mit dieser Technik nur begrenzt möglich, da immer eine Interferenz der zu untersuchenden Substanz mit den einzelnen Enzymen des nachgeschalteten Prostaglandinsynthesekomplexes mit in Betracht gezogen werden muß.

Es ergab sich somit folgende Fragestellung:

- a) Entwicklung eines Systems zur Aktivitätsbestimmung der Phospholipase A_2 anhand der Messung des Reaktionsendproduktes, der freigesetzten Arachidonsäure,
- b) Einfluß unterschiedlicher pharmakologisch aktiver Substanzen und
- c) Untersuchung der Aktivität der renalen Phospholipase A_2 unter wechselnder Kochsalzbelastung.

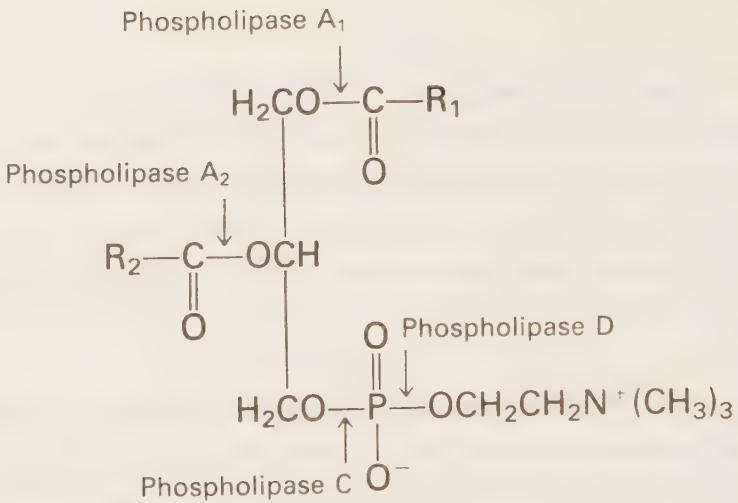
III. Material und Methoden

3.1. Substratbiosynthese zur spezifischen Messung der Phospholipase A_2 -Aktivität (modifiziert nach Blackwell et al. sh.(8))

Theoretische Beschreibung der beteiligten enzymatischen Reaktionen

Aus freier Arachidonsäure C 20:4 n-6 entsteht in vivo eine Vielzahl verschiedener Stoffgruppen, die "klassischen" Prostaglandine PGE_2 und PGF_2 , Thromboxan TXA_2 , Prostaglandin PGI_2 sowie monohydroxylierte Fettsäuren HETE's und die Leukotriene LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 . Die letzten drei bilden als Gemisch die seit längerem bekannten "slow reacting substances of anaphylaxis".

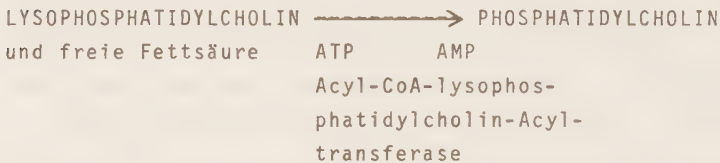
Wie bereits erwähnt liegt die Arachidonsäure nicht als freie Fettsäure (FFS), sondern verestert gebunden in der 2-Position der verschiedenen Membranphospholipide Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin vor, wobei Phosphatidylcholin quantitativ in der Niere das bedeutendste Phospholipid darstellt. Die Freisetzung der Arachidonsäure wird katalysiert durch die membrangebundene Phospholipase A_2 , die spezifisch an der 2-Position des Phospholipids wirkt.



Die Reaktion



steht im Gleichgewicht mit der Reaktion



Um die spezifische Aktivität der PLA₂ radiochemisch zu bestimmen, wird ein Phospholipid als Substrat benötigt, das in der 2-Position eine ¹⁴C-hochungesättigte Fettsäure, z.B. ¹⁴C-C20:4, als R₂ trägt. Die bei der Abspaltungsreaktion freigesetzte markierte Fettsäure kann dann quantitativ gemessen werden. Um eine markierte Arachidonsäure in das Phospholipidmolekül einzubauen, wird die oben beschriebene Acyltransferasereaktion benutzt: als acylierendes System werden Rattenlebermikrosomen verwendet.

3.2. Präparation von Rattenlebermikrosomen

Die Versuchstiere waren männliche ältere Ratten. Die mit Chloroform betäubten Tiere wurden durch Decapitation getötet; sofort danach wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Leber entnommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte in 250 mM Glucoselösung bei einer Temperatur von +4°C. Das Feuchtgewicht der Leber wurde auf 11 g eingestellt und auf 66 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Homogenisation erfolgte im Potter nach vorheriger Zerkleinerung bei maximaler Umdrehungszahl für 2 x 15 Sekunden.

Die sofort anschließende Zentrifugation mit einer Dauer von 20 Minuten bei 100 000 x g zur Mikrosomenherstellung erbrachte eine mikrosomale Fraktion, die nach Resuspendierung in 2 ml Glucoselösung, 250 mM, bei einer Temperatur von -20°C über mehrere Wochen stabile Aktivität zeigte.

3.3. Praktisches Vorgehen

3.3.1. Reaktionsansatz

In ein Reagenzglas werden 2,5 uCi ^{14}C -C20:4 (in alkoholischer Lösung, spezifische Aktivität 40-60 mCi/mmol, Fa.NEN), 20 ug nicht markierte C 20:4 (Fa.Sigma) und 200 ug Lysolecithin (Fa.Supelco) gegeben.

Die organischen Lösungsmittel werden unter vorsichtiger Stickstoffbegasung entfernt. Nach Zugabe von 1,5 ml K_2HPO_4 -Puffer, pH 7,5, 100 mM, wird das Gemisch in einem Ultraschallgerät (Fa.Braun) 10 Minuten bei 50 Watt beschallt, um die Lipide in eine disperse Lösung zu überführen.

Als Energiedonatoren und Cofaktoren werden benötigt:

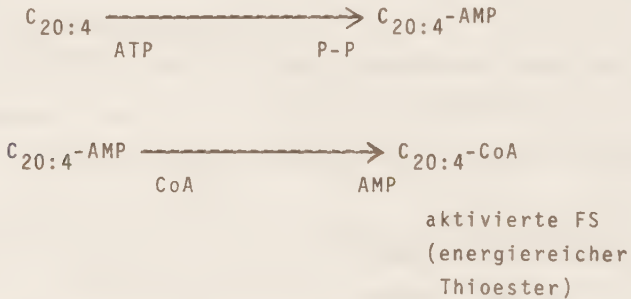
ATP (2 μ M) in Tris-Puffer (pH eingestellt auf 7,4);

Azyl-Coenzym A (20 nM) in Tris-Puffer pH 7,4;

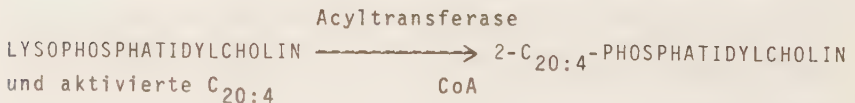
Magnesiumchlorid (20 μ M) in Tris-Puffer pH 7,4;

Lebermikrosomen als acylierendes System: 30 μ l aus 2 ml
100 000 x g-Suspension von 11 g Feuchtgewicht.

Für die Anlagerung der C 20:4 an die 2-Position des Lysole-
zithins muß die freie Fettsäure als Azyl-Coenzym A-Verbin-
dung vorliegen. Diese Aktivierung erfolgt unter Verbrauch
von ATP als Energiedonator und verläuft in 2 Schritten:



Durch die oben beschriebene Acyltransferase-Reaktion wird
danach die aktivierte Fettsäure in das Lysolezithinmolekül
eingebaut.



3.3.2. Inkubation, Extraktion

Der pH-Wert des Reaktionsgemisches (EV=2 ml) wird während der nun folgenden 3-stündigen Inkubationsperiode konstant bei 7,4 gehalten, Temperatur 37°C (Wasserbad Fa.GFL).

Die Reaktion wird gestartet mit der Zugabe der Energiedonatoren, Cofaktoren und der Lebermikrosomen. Nach 30 und 120 Minuten erfolgt eine weitere Zugabe dieser Reaktionsbausteine unter Kontrolle des pH-Wertes.

Nach 180 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml eines kalten Chloroform-Methanolgemisches (2:1 v/v) gestoppt. Die Chloroform-Phase, die die Lipide enthält, wird im Faltenfilter mit einer geringen Menge Magnesiumsulfat getrocknet. Dieser Extraktionsvorgang erfolgt dreimal.

3.3.3. Überprüfung der Reaktion mit Radiodünnschichtchromatographie

Um die Vollständigkeit der abgelaufenen Reaktion zu überprüfen, wird nun eine geringe Menge des entstandenen 2-¹⁴C-C 20:4-Phosphatidylcholins in der lipidhaltigen Chloroform-Phase auf eine Dünnschichtplatte (Fa.Merck, Kieselgel 60) aufgetragen. Die mobile Phase besteht aus einem Gemisch Chloroform-Methanol-Wasser im Verhältnis 65:25:4 (v/v). Die Laufzeit des Fließmittels betrug bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde.

Es zeigte sich, daß von der zugegebenen markierten C 20:4 mehr als 75% an das Lysolezithinmolekül angelagert waren (sh.Abb.1A).

Zur Abtrennung noch vorhandener freier Arachidonsäure und anderer Fettsäuren wird der Extrakt nun konzentriert und auf eine Chromatographiesäule, die aus 16 mg Silicic Acid (Unisil, Fa.Clenkson) und 4 mg HyFlo (Fa.Serva) besteht, aufgetragen. Freie Fettsäuren werden mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol im Verhältnis 9:1 (v/v) eluiert, das radioaktiv markierte Phospholipid mit Chloroform/Methanol i.V. 6:4 (v/v). Kleine Äquivalente aus den einzelnen Fraktionen werden in einem Szintillationszähler gezählt (Fa.Packard) und die dem radioaktiven Phosphatidylcholin-Peak korrespondierenden Fraktion vereinigt.

Die Überprüfung des markierten Phosphatidylcholins ergab nun eine radiochemische Reinheit von ca. 99% (sh.Abb.1B). Die Wiederfindungsrate nach Säulenchromatographie lag bei ca.60% (sh.Beispiele).

Zur Herstellung eines größeren Pools dieses 2-¹⁴C-C 20:4-Phosphatidylcholins wurde der Versuch ca. 20 mal mit gleichen quantitativen Verhältnissen wiederholt und die einzelnen Extrakte nach Prüfung vereinigt.

Wiederfindungsraten nach Säulenchromatographie bei eingesetzten 2.75×10^6 cpm ¹⁴C-C_{20:4} (Beispiele):

Datum	Recovery (cpm)	%
12.8.	1.48×10^6	53%
13.8.	1.49×10^6	54%
13.8.	1.62×10^6	58%

Datum	Recovery	%
14.8	1.92×10^6	69%
15.8	1.87×10^6	68%
Mittel $\pm$ SD	$1.67 \times 10^6 \pm 0.18 \times 10^6$	60.4 ± 6.82

Mittlere spezifische Aktivität der verwendeten ^{14}C -C 20:4:
48.6 mCi/mmol

Molekulargewicht: MW=304,5

Daraus folgt: 48.6 mCi = 1mmol = 304,5 mg

$$2,5 \text{ uCi} = 0,05 \text{ umol} = 15,7 \text{ ug}$$

$$1 \text{ uCi} = 1,1 \times 10^6 \text{ cpm}$$

Zugabe zum Substratansatz: $2,5 \text{ uCi} = 2,75 \times 10^6 \text{ cpm} = 15,7 \text{ ug}$

Das anzunehmende Mischungsverhältnis innerhalb des Phosphatidylcholins zwischen markierter und unmarkierter ("kalter") Arachidonsäure beträgt bei zugegebenen 15,7 ug ^{14}C -C 20:4 und den als Carrier zugegebenen 20 ug kalter C 20:4 1:1,3. Somit ergibt sich für das Substrat eine spezifische Aktivität von 21,1 mCi/mmol.

3.3.4. Testung mit hochgereinigter Standardphospholipase A_2

Um die Position der eingebauten ^{14}C -C 20:4 zu überprüfen, wird das biosynthetisierte markierte Phospholipid durch eine für die 2-Position spezifische Phospholipase A_2 (Boehringer, Mannheim, snake-venom-Enzym EC 3.1.1.4) hydrolysiert. Die Reaktion erfolgt in Tris-HCl-Puffer, 100mM, pH 7,4; es werden 100 000 cpm ^{14}C -C 20:4-PC in alkoholischer Lösung als Substrat eingesetzt. Nach Abblasen des organischen Lösungsmittels werden 900 ul eisgekühlter Tris-HCl-Puffer

zugegeben und das Gemisch 3 Minuten bei 50 Watt beschallt. Als Cofaktor dient CaCl_2 (10mM); das Endvolumen des Reaktionsgemisches beträgt 1 ml.

Das in Glycerin gelöste Enzym (Konzentration 1 mg/ml, 200 IE/mg) wird in eiskaltem Wasser 1:10 verdünnt. Diese Lösung erwies sich als unbeständig und mußte für jede Ansatzserie neu zubereitet werden. Es wurde 1 µg Enzym zugesetzt (= 0,2 IE). Die Inkubation (60 min./37° im Wasserbad) wird durch 3-malige Extraktion mit einem kalten Chloroform-Methanol-Gemisch im Verhältnis 2:1 (v/v) gestoppt, der Chloroform-Überstand im Vakuum getrocknet und quantitativ auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Das Fließmittel besteht aus Chloroform-Methanol-Wasser im Verhältnis 65:25:4 (v/v).

Das 2- ^{14}C -C 20:4-PC hat in diesem System aufgrund seiner geringen Polarität einen kleinen Wert R_f -Wert ($\sim 0,2$), die polare abgespaltene freie ^{14}C -C 20:4 läuft praktisch an der Lösungsmittelfront ($R_f \sim 1$) (sh. Abb. 1C).

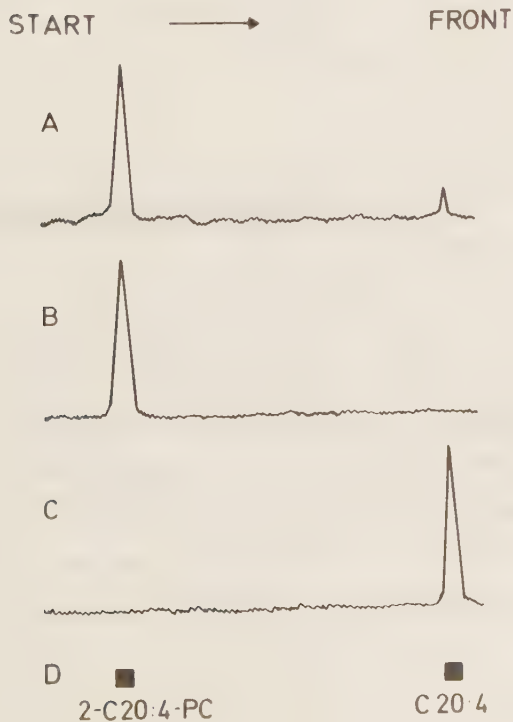
Die Quantifizierung dieser Reaktion erfolgte nach Elution der Produkte aus entsprechend ausgekratzten Kieselgelzonen im Betazähler.

Etwaig auftretende positive oder negative Quench-Effekte durch das Kieselgel wurden ausgeschlossen.

Eingesetzt	1	2	3
6 cm ² Kieselgel ohne ^{14}C -C 20:4-PC	18	15	11 cpm
6 cm ² Kieselgel mit 20 000 cpm ^{14}C -C 20:4-PC (nach Inkubation ohne Enzym)	19 950	19 700	19 730 cpm

Abb 1A-D: Schritte der Biosynthese von 2-¹⁴C-C 20:4-Phosphatidylcholin; Radiodünnschichtchromatographie wie in Material und Methode beschrieben.

- A) Überprüfung der Vollständigkeit der abgelaufenen Reaktion vor säulenchromatographischer Reinigung,
- B) Reinheit des Substrates nach Säulenchromatographie;
- C) Testung mit hochgereinigter Standardphospholipase A₂;
- D) Unmarkierte Standardsubstanzen, mit 2',7'-Dichlorfluorescein im UV-Licht visualisiert.



Um Schwankungen der gelösten Substratmenge nach Beschallung zu vermeiden, wurde versucht, das Substrat in einer geringen Menge Äthanol (1% des Inkubationsendvolumens) aufzunehmen. Dabei ergab sich eine deutlich verbesserte und konstante Wiederfindungsrate vor Inkubation. Auf die enzymatische Reaktion hatte diese Änderung keinen Einfluß.

Eingesetzt	Wiederfindung nach Beschallung (50W, 2x20sec) in C ₂ H ₅ OH	Wiederfindung nach Aufnahme
20 000 cpm	12 400 cpm = 62.3 %	19 530 cpm = 97.7 %
20 000 cpm	17 020 cpm = 85.1 %	19 123 cpm = 95.6 %
20 000 cpm	19 831 cpm = 99.2 %	19 553 cpm = 97.8 %

Im Folgenden wurde immer mit der Aufnahme des Substrates in Äthanol gearbeitet.

3.4. Kinetische Untersuchungen mit Standardphospholipase A₂ (EC 3.1.1.4)

Anhand des beschriebenen Assays wurde nun eine Charakterisierung der Phospholipase A₂ aus *Crotalus durissimus terrificus* (snake venom enzyme EC 3.1.1.4, Fa.Boehringer, Mannheim) vorgenommen. Zur Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wird die Enzymmenge konstant gehalten und das Substratangebot in weiten Grenzen variiert.

Bei einer Temperatur von 37°C wird 1 ng Enzym (= 2×10^{-4} IE) mit Substratkonzentrationen zwischen 20 000 cpm und 800 000

cpm (= 0.86 μ M bis 34.4 μ M) inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgt durch die Zugabe von CaCl_2 in einer Konzentration von 10mM, nachdem gezeigt werden konnte, daß ohne Zugabe dieses Cofaktors keine Umsetzung über den Bereich der spontanen Hydrolyse hinaus nachzuweisen war. Extraktion und quantitative Auswertung erfolgen wie vorher beschrieben.

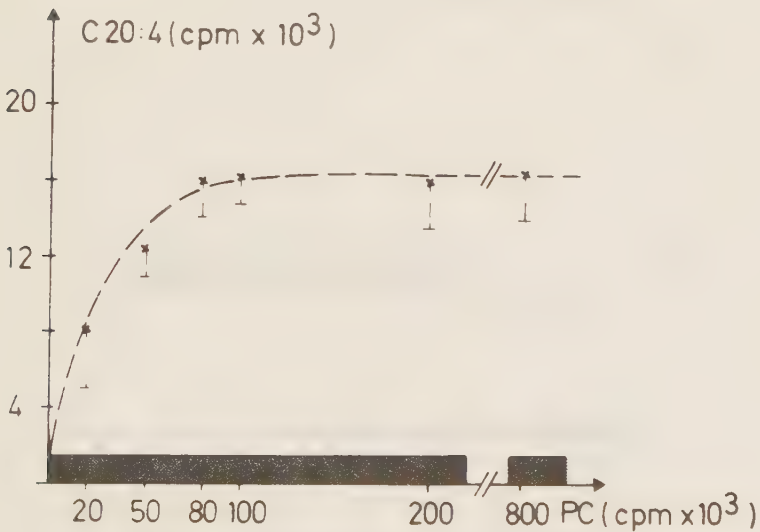


Abb.2: Substratsättigungskurve: 2-¹⁴C-C 20:4-PC + PLA₂
 — Lyso-PC + freie ¹⁴C-C 20:4. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Rate der spontanen Hydrolyse. Inkubationszeit: 30min; Enzymmenge: 1ng; Cofaktor: 10mM Ca⁺⁺; (Mittelwert $\pm$ SD aus 3 Experimenten).

Die Enzymabhängigkeit wird durch eine lineare Korrelation im Bereich 0,25 bis 2 ng Enzym ($= 0,5 \times 10^{-4}$ bis 4×10^{-4} IE) bei einer Substratkonzentration von 200 000 cpm ($= 8,6 \mu\text{M}$) und sonst identischen Bedingungen beschrieben.

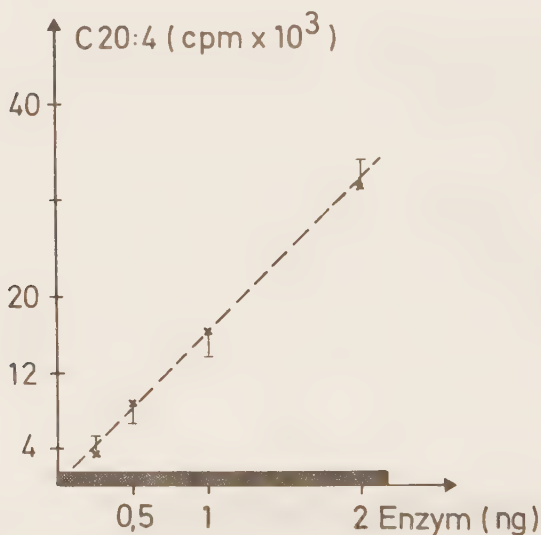


Abb.3: Enzymkonzentrationskurve: 2-¹⁴C-C 20:4-PC + PLA₂
— Lyso-PC + freie ¹⁴C-C 20:4. Inkubationszeit: 30min; Substratkonzentration: 8,6 μM ; Cofaktor: 10mM Ca⁺⁺; (Mittelwert $\pm$ SD aus 3 Experimenten).

Die Zeitverlaufskurve ist charakterisiert durch Stabilität über 30 min Inkubationszeit.

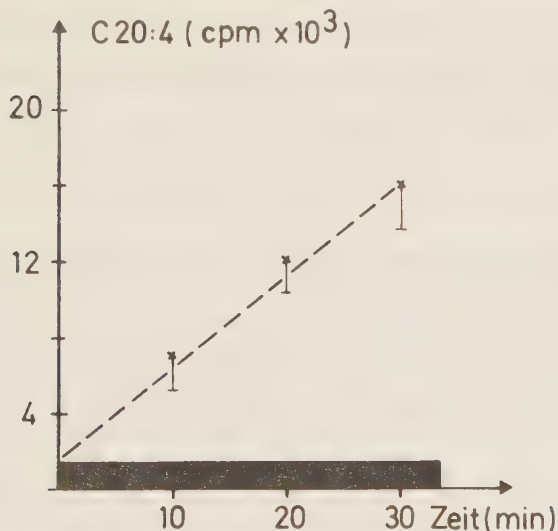


Abb.4: Zeitverlaufskurve: 2-¹⁴C-C 20:4-PC + PLA₂
 — Lyso-PC + freie ¹⁴C-C 20:4. Substratkonzentration: 8,6 uM; Enzymmenge: 1 ng; Cofaktor: 10 mM Ca⁺⁺; (Mittelwert $\pm$ SD aus 3 Experimenten).

3.5. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Bastard-Kaninchen mit einem Gewicht von durchschnittlich 3,3 kg verwendet. Zu beobachten war, daß im Zeitraum der kontrollierten Nahrungszufuhr eine Gewichtszunahme von im Mittel 400 g auftrat. Um möglichst auszuschließen, daß bei den Versuchstieren während der Futterzeit mit standardisierten Diäten Krankheiten oder sonstige Störungen auftraten, wurden die Tiere vor Beginn

des Ernährungsversuches einige Wochen im Normalkäfig beobachtet. Wenn diese Zeit störungsfrei verlief, begann die Fütterung mit den speziellen Diäten (Fa.Altromin), der Kochsalzgehalt des Futters war gegenüber der Kontrollgruppe um den Faktor 2,5 angehoben. Die Menge der Nahrung ebenso wie die zugeführte Flüssigkeitsmenge richteten sich nach Hunger und Durst der Versuchstiere.

Kontrollgruppe (Normaldiät)

NaCl-reiche Diät

Hase	Gewicht(kg)				Hase	Gewicht(kg)			
Aufenthalt	Beginn prae	OP	Zunahme		Aufenthalt	Beginn prae	OP	Zunahme	
Nr.14	3.4	3.8	0.4		12	2.2	3.0	0.8	
20 Tge.					34 Tge.				
Nr.15	3.6	4.2	0.6		13	3.8	4.3	0.5	
26 Tge.					19 Tge.				
Nr.18	3.6	3.9	0.3		16	3.5	3.7	0.2	
21 Tge.					20 Tge.				
Nr.22	2.9	3.3	0.4		19	2.9	3.4	0.5	
30 Tge.					30 Tge.				
Nr.28	3.3	3.5	0.2		21	3.5	3.7	0.2	
20 Tge.					42 Tge.				
Nr.29	3.5	3.6	0.1		26	3.6	3.9	0.3	
20 Tge.					42 Tge.				
Mittel	23 Tge.	3.38kg	3.71kg	0.33kg	31 Tge.	3.25	3.64	0.42	

3.5.1. Präparation

Zur Narkose wurde ein Gemisch, bestehend aus Pentobarbital (Nembutal^R) und 0,9% Kochsalzlösung im Verhältnis 1:4 verwendet. 2 ml dieser Lösung wurden zu Beginn der Operation als Bolusinjektion in eine Ohrvene des Versuchstieres gespritzt, die weitere Zufuhr erfolgte langsam nach Bedarf. Um ausreichende Schlaftiefe und Analgesie der Versuchstiere zu erreichen, werden im allgemeinen ca. 4 ml der Narkoselösung benötigt.

Nach Erreichen der nötigen Narkosetiefe, die nach ca. 1 Minute eintrat, wurde die Bauchhöhle von ventral her eröffnet, beide Nieren und die zugehörigen Gefäße dargestellt, abgeklemmt und entfernt. Sofort nach Entnahme der Nieren wurde umgebendes Fettgewebe und Nierenkapsel entfernt und die Nieren bei einer Temperatur von +4°C in Tris-HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,4 zur Weiterverarbeitung gebracht. Die Zeit von der Einleitung der Narkose bis zur Nierenentnahme betrug ca. 200 Sekunden.

Die Nieren wurden nun entlang der großen Circumferenz mit einem Längsschnitt gespalten und unter schwacher mikroskopischer Vergrößerung das Mark vom Cortex getrennt. Um die Zeitspanne der Präparation möglichst kurz zu halten, wurde großzügig präpariert. Die Ausbeute an Cortexgewebe betrug pro Hase ca. 7-8 g Feuchtgewicht Rindengewebe. Zur Standardisierung der Methode wurden 6 g des Feuchtgewichtes weiter verarbeitet.

Das Cortexgewebe wurde bei einer Temperatur von +4°C in vorgekühlten Gefäßen mit Tris-HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,4, im Verhältnis 1:10 verdünnt, d.h. 6 g Feuchtgewicht wurde auf 60 ml Endvolumen aufgefüllt.

Die Homogenisation erfolgte im Potter (Fa.Braun) bei maximaler Umdrehungszahl (1300 Upm). Um dabei unerwünschte Temperaturanstiege mit möglicher Stimulation des PLA_2 zu vermeiden, wurde die Zeit auf 3 mal 10 Sekunden mit je einer Minute Pause beschränkt, was zur vollständigen Homogenisation genügte. Das so entstandene Homogenat wurde sofort in Portionen à 10 ml auf sechs Zentrifugengläser verteilt und in einen vorgekühlten Rotor (Typ Ti 50, Fa.Beckmann) eingebracht.

Die durchschnittliche Zeitspanne von Einleitung der Narkose bis zum ersten Zentrifugationsgang betrug im Mittel 7 Minuten, die Zeitspanne zwischen Entnahme und Beginn der Zentrifugation ca. 4 Minuten. Alle Behälter und Lösungen waren vorgekühlt, um die Temperatur möglichst konstant niedrig zu halten.

3.5.2. Herstellung der Mikrosomen, Aufbewahrung

Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Typ L 5.50, Fa.Beckmann) in 4 Schritten:

- a) 10 Minuten mit 1000 x g zur Entfernung des Zelldebris
- b) 15 Minuten mit 10 000 x g zur Abtrennung von Mitochondrien und Vorreinigung der Mikrosomenfraktion
- c) 60 Minuten mit 100 000 x g zur Gewinnung einer angereicherten Mikrosomenfraktion.

Nach dem dritten Zentrifugationsgang wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml einer wässrigen Albuminlösung (Rinderserumalbumin, 1 mg / ml, Fa.Sigma) zum Abfangen

eventuell vorhandener freier Fettsäuren resuspendiert. Nach vollständiger Resuspendierung erfolgte eine vierte Zentrifugation mit einer Dauer von 60 Minuten bei 100 000 x g. Danach wurde der Albumin/Wasser-Überstand vollständig verworfen und die Mikrosomen in 1 ml Tris-HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,4, resuspendiert.

Die mikrosomalen Suspensionen wurden in Eppendorf-Röhrchen überführt, unter flüssigem Stickstoff innerhalb einer Minute tiefgefroren und lyophilisiert (Lyophilisator Fa. Leybold-Heraeus). Die Dauer betrug im allgemeinen 12 Stunden. Die so entstandene gefriergetrocknete Mikrosomenfraktion wurde zermörsert und bei -80°C aufbewahrt.

Diese Aufbereitung garantiert eine über mehrere Monate hinaus stabile und reproduzierbare Aktivität der zu messenden Enzyme.

3.6. Spezifität der Methode

3.6.1. Enzymkinetik im Bioassay

Mit dem beschriebenen Ansatz wurde nun die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ aus Mikrosomen der Kaninchen-nierenrinde untersucht. Als Enzymquelle diente ein Pool aus Mikrosomen von 8 Kaninchen unter Kontrollbedingungen.

Es zeigt sich eine lineare Korrelation der enzymatischen Hydrolyse zur Menge der eingesetzten Mikrosomenfraktion, bezogen auf den Proteingehalt der Präparation (Proteinbestimmung nach Lowry(36), Rinderserumalbumin als Standard).

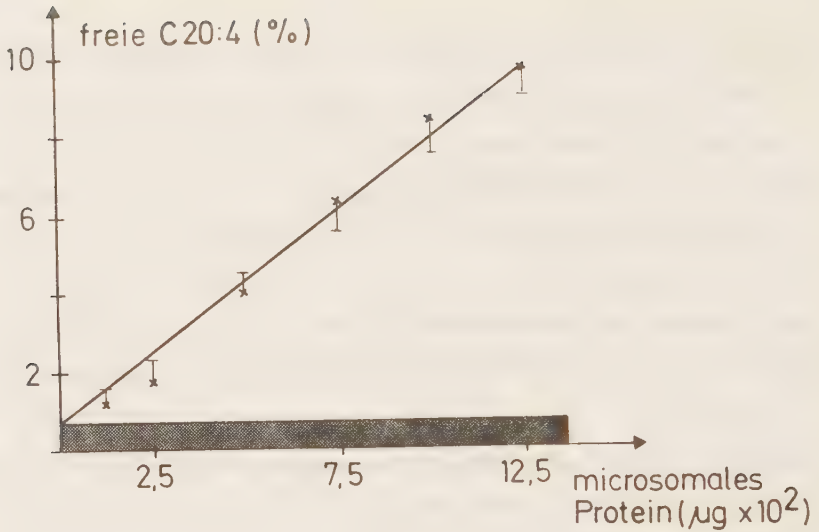


Abb.5: Enzymkonzentrationskurve: 2- ^{14}C -C 20:4-PC + PLA₂
 — Lyso-PC + freie ^{14}C -C 20:4, mikrosomale
 Phospholipase A₂. Substratkonzentration: 8,6 μM ;
 Inkubationszeit: 30 min; Cofaktor: 10 mM Ca^{++} ;
 Angabe in % freie ^{14}C -C 20:4; (Mittelwert $\pm$ SD
 aus 4 Experimenten).

3.6.2. Einfluß des pH-Wertes

In in vitro-Systemen ist für die Phospholipase A₂ ein pH-Optimum im alkalischen Bereich beschrieben (10). Wir untersuchten im Bioassay die Aktivität renaler Phospholipase A₂ im Bereich pH 6 bis pH 9.

Es zeigt sich bei Alkalisierung des Inkubationsmilieus bis pH 9 keine signifikante Steigerung der enzymatischen Aktivität, im sauren Bereich resultiert ein deutlicher Abfall der Menge an freigesetzter Arachidonsäure.

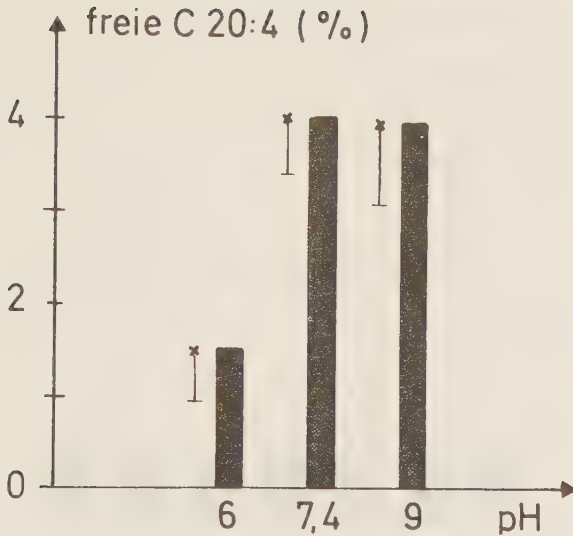


Abb.6: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität mikrosomaler Phospholipase A_2 . Bedingungen wie beschrieben; 4 mg Mikrosomenfraktion, Proteingehalt 600ug (Mittelwerte $\pm$ SD aus 3 Experimenten).

3.6.3. Calcium als Cofaktor der enzymatischen Reaktion

In verschiedenen Systemen ist Calcium neben anderen 2-wertigen Kationen als essentieller Cofaktor für die Phospholipase A_2 beschrieben (6,21). Die Untersuchung am Modell der Nierenrindenmikrosomen zeigt, daß die enzymatische Hydrolyse des Substrates mit und ohne Zugabe von exogenem Calcium in gleichem Umfang abläuft. Durch Zugabe von EDTA mit einer Vorinkubation der Mikrosomen über 10 min kann eine konzentrationsabhängige Hemmung der Hydrolyse nachgewiesen werden; dieser Effekt ist durch Zugabe von exogenem Calcium reversibel und kann somit nicht als direkte Interaktion des Chelatbildners mit dem zu untersuchenden Enzym angesehen werden.

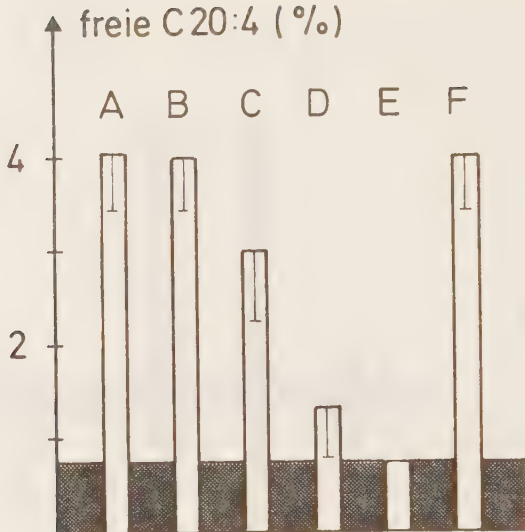


Abb.7: Einfluß von Calcium auf die Hydrolyse von ^{14}C -C20:4-PC durch mikrosomale Phospholipase A_2 . 4 mg Mikrosomenfraktion; Bedingungen wie beschrieben; Start der Reaktion durch Zugabe des Substrates; A) Kontrolle B) ohne exogenes Ca^{++} C) Vorinkubation mit EDTA 200uM D) EDTA 1mM E) EDTA 10mM F) Vorinkubation mit EDTA 10mM, danach Zugabe von Ca^{++} in üblicher Konzentration; (Mittelwert $\pm$ SD aus 3 Experimenten).

3.6.4. Hemmung durch Mepacrin/Indomethacin

Das (therapeutisch nicht mehr gebräuchliche) Antimalariamittel Mepacrin und nichtsteroidale Antiphlogistika, insbesondere Indomethacin, sind als Inhibitoren der Phospholipase A_2 beschrieben (20).

Es zeigt sich für Mepacrin eine dosisabhängige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität nach einer Vorinkubation der Mikrosomen über 10 min; eine Konzentration von 5 mM führt zur vollständigen Hemmung des Enzyms.

Im Gegensatz dazu findet sich für Indomethacin in Konzentrationen bis 100 μM kein Effekt; erst bei einer Konzentration von 280 μM , die weit jenseits eines etwa therapeutisch zu erreichenden Bereiches ($\sim 30 \mu\text{M}$) liegt, ist eine teilweise Inhibierung nachzuweisen.

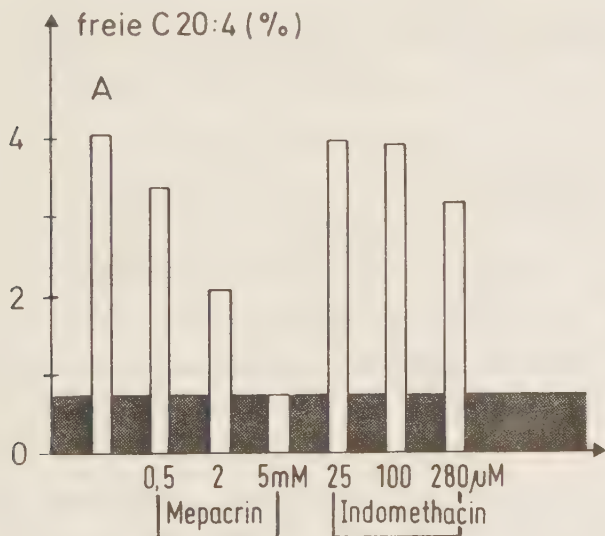


Abb.8: Einfluß von Mepacrin und Indomethacin auf die enzymatische Hydrolyse von $2\text{-}^{14}\text{C}\text{-C } 20:4\text{-Pc}$ durch mikrosomale Phospholipase A_2 . Bedingungen wie beschrieben; Vorinkubation der Mikrosomen mit zu untersuchender Substanz: 10 min; A) Kontrolle; (Mittelwerte aus 2 Experimenten).

3.6.5. Untersuchung der Acyltransferase-Gegenreaktion

Die enzymatische Hydrolyse von Membranphospholipiden führt neben der Freisetzung von Fettsäuren zur Bildung von Lyso-phospholipiden, die als sehr toxisch beschrieben sind (2,73). In verschiedenen Geweben und Zelltypen sind Acyltransferasen nachgewiesen, die unter Energieverbrauch den schnellen Einbau von freien Fettsäuren in Lysophospholipide katalysieren (40), ein "acylierendes System" wurde bei der Biosynthese des Substrates in Form von Lebermikrosomen verwendet.

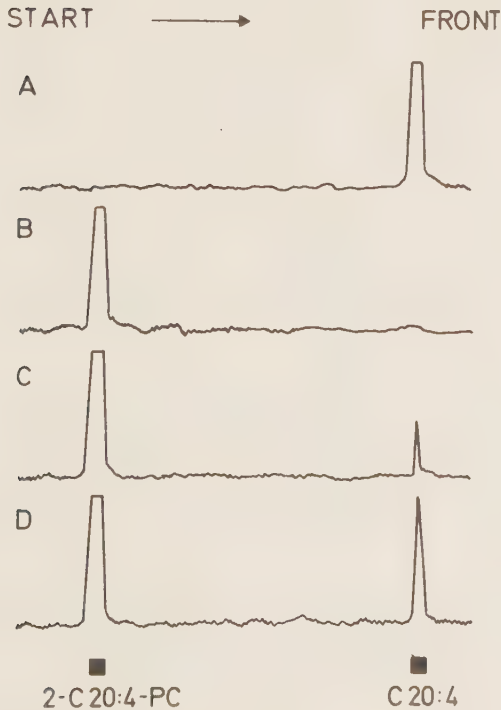
Um auszuschliessen, daß diese Gegenreaktion in dem beschriebenen Versuchsansatz interferiert, wurden die Inkubationsbedingungen der renalen Acyltransferasen näher untersucht. Es zeigt sich, daß auch Nierenrindenmikrosomen in der Lage sind, unter geeigneten Bedingungen wie durch Zugabe von Energiedonatoren (ATP, Coenzym A) und Cofaktoren (Mg^{++}) als acylierendes System zu fungieren (sh.Abb. 9B). Ohne ATP und Coenzym A ist keine reacylierende Aktivität nachzuweisen (sh.Abb. 9A). Die Zugabe von Mg^{++} , das als essentieller Cofaktor für die Acyltransferase humaner Makrophagen beschrieben ist (31), war in dem hier verwendeten System nicht erforderlich (sh.Abb. 9B).

Aus diesen Resultaten kann gefolgert werden, daß eine Zugabe von ATP und Coenzym A zum hier beschriebenen Ansatz zur Messung der Phospholipase A_2 -Aktivität die Hydrolyserate durch gleichzeitige Reacylierung der freien Fettsäure senken müßte; es zeigt sich bei Mitinkubation dieser Substanzen eine um ca. 50% reduzierte Freisetzung der Arachidonsäure, die wiederum nicht an die Zugabe von Mg^{++} gekoppelt war (sh.Abb.9C).

Abb.9A-D: Acyltransferaseaktivität in Nierencortexmikrosomen

- A) Lysolecithin + ^{14}C -C20:4 + Nierenrindenmikrosomen
B) Lysolecithin + ^{14}C -C20:4 + ATP/Coenzym A $\pm$ Mg^{2+} ;
C) 2- ^{14}C -C20:4-PC + mikrosomale Phospholipase A_2 + ATP/Coenzym A $\pm$ Mg^{2+} ;
D) Kontrolle

Unmarkierte Standardsubstanzen, mit 2',7'-Dichlorfluorescein visualisiert.



Die Spezifität der hier vorgestellten Methode zur Bestimmung der Aktivität renaler Phospholipase A_2 ist somit durch folgende Charakteristika nachgewiesen:

- a) radiochemische Reinheit des verwendeten Substrates, spezifische Markierung an der 2-Position
- b) Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion von Enzymmenge und Cofaktor
- c) Hemmung mit pharmakologischem Inhibitor
- d) Ausschluß einer möglichen Interferenz durch das Acyltransferasesystem.

IV. Resultate

4.1. Untersuchung der Aktivität der renalen Phospholipase A₂ am Kaninchen unter normaler und hoher Kochsalzbelastung

Als Kontrollparameter der Kochsalzaufnahme dienten:

1. Bestimmung der Natriumausscheidung im 24-Stundenurin;
2. Messung der Plasmareninaktivität;
3. Renale Ausscheidung von Prostaglandin E₂.

Die Natriumausscheidung stieg in der kochsalzreich ernährten Gruppe um den Faktor 7,3 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant an ($43,2 \pm 14,4$ mval/die Kontrolle versus $317 \pm 72,4$ mval/die, $MW \pm SD$, $n=6$ pro Gruppe, $p < 0,001$, Student's t-test).

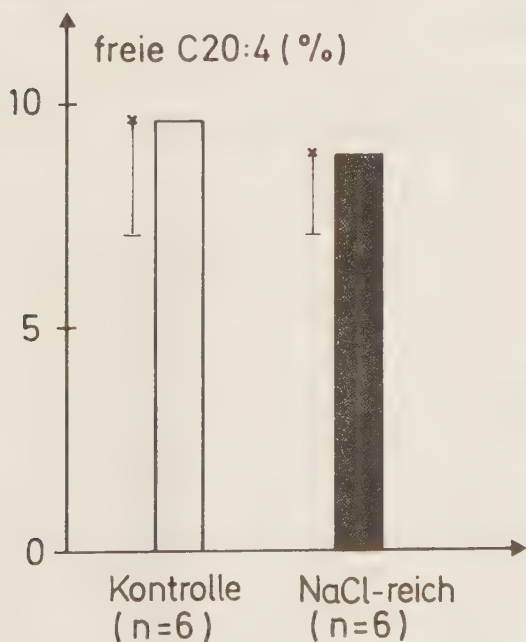
Die Plasmareninaktivität, bestimmt nach (70), fiel von $7,1 \pm 2,1$ ng/mlxh in der Kontrollgruppe auf $1,47 \pm 0,89$ ng/mlxh in der kochsalzbelasteten Gruppe ab ($MW \pm SD$, $p < 0,005$).

Die mittlere renale Ausscheidung von Prostaglandin E₂ wurde unter Kontrollbedingungen mit $1,18 \pm 0,31$ ng/ml bestimmt, unter Kochsalzbelastung zeigte sich ein Abfall auf $0,39 \pm 0,12$ ng/ml ($p < 0,005$).

Eine Übersicht über die Einzelbestimmungen gibt die folgende Tabelle.

<u>Kontrollgruppe (n=6)</u>				<u>Kochsalzreich ernährte Gruppe (n=6)</u>			
Hase Nr.	Na ⁺ (mval/die)	PRA (ng/mlxh)	PGE ₂ i. Urin (ng/ml)	Hase Nr.	Na ⁺ (mval/die)	PRA (ng/mlxh)	PGE ₂ (ng/ml)
14	48	4.28	1.62	12	325	1.38	0.28
15	13	9.44	1.04	13	298	1.44	0.45
18	56	4.86	0.94	16	234	2.32	0.62
22	46	8.37	0.78	19	465	0.2	0.29
28	55	9.31	1.14	21	270	2.82	0.41
29	41	6.15	1.55	26	310	0.64	0.30
MW $\pm$ SD	43.2 $\pm$ 14.4	7.1 $\pm$ 2.1	1.18 $\pm$ 0.31	317 $\pm$ 72.4	1.47 $\pm$ 0.89	0.39 $\pm$ 0.12	

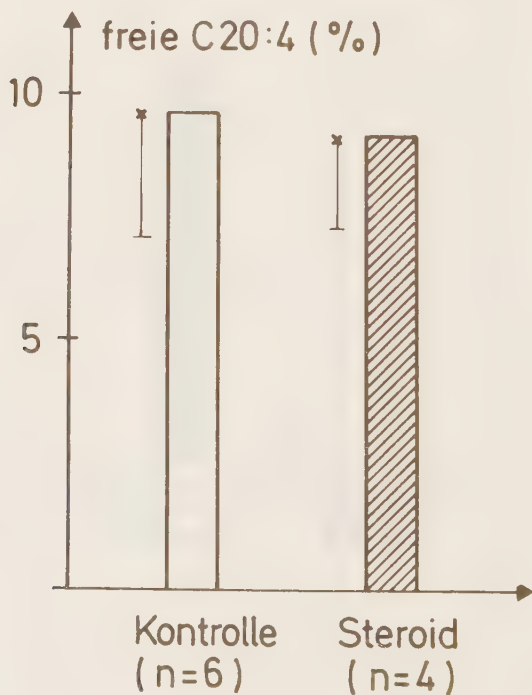
Die Bestimmung der Aktivität der Phospholipase A_2 aus Kaninchennierenmikrosomen anhand der vorher beschriebenen Technik erbrachte mit einer mittleren Freisetzung an Arachidonsäure von $9.62 \pm 2.5\%$ pro mg Protein x 30min in der Kontrollgruppe gegenüber $8.87 \pm 1.84\%$ pro mg Protein x 30min in der kochsalzreich ernährten Gruppe keine statistisch signifikante Differenz, ein direkter Einfluß einer positiven Kochsalzbilanz auf das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese war somit an unserem Modell nicht nachweisbar.



4.2. Untersuchung der Aktivität der renalen Phospholipase A_2 am Kaninchen unter Steroideinfluß.

Es wurde eine hohe Dexamethasondosis von 1 mg/kg Körpergewicht über 3 Tage, verteilt auf 2 Dosen täglich, intravenös appliziert. Am 4.Tag wurde 2 Stunden nach der morgendlichen Gabe die Mikrosomenpräparation vorgenommen.

Die Untersuchung der Phospholipase A_2 -Aktivität zeigte mit einer mittleren Arachidonsäurefreisetzung von $9.15 \pm 1.95\%$ pro mg Protein $\times$ 30min ($n=4$, $MW \pm SD$) keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, eine direkte steroidinduzierte Inhibierung der Phospholipase A_2 war nicht nachzuweisen.



V. Diskussion

Die membrangebundene Phospholipase A_2 wird als Schlüsselenzym des Arachidonsäuremetabolismus angesehen. Da ihre Aktivität das Substratangebot für die Weiterverstoffwechslung via Cyclooxygenase und Lipoxygenase limitiert, ist eine Untersuchung des Enzyms insbesondere in den Orten, in denen den Prostaglandinen eine wichtige Mediatorrolle zukommt, von besonderem Interesse. Die renale Prostaglandinsynthese ist bisher durch meist radioimmunologische Bestimmung in Gewebe, Blut und Urin charakterisiert (11,55), andere Autoren untersuchten die renale Stoffwechselleistung vor und nach Inhibierung der Prostaglandinsynthese (3,64). Die so gewonnenen Resultate lassen Aussagen über einzelne Enzyme nur in begrenztem Umfang zu, eine genaue Lokalisation des Angriffspunktes stimulierender oder inhibierender Substanzen erscheint ebenfalls nur ungefähr möglich. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Aktivitätsbestimmung der renalen membrangebundenen Phospholipase A_2 zu entwickeln, die unabhängig von der weiteren Metabolisierung der als Reaktionsprodukt freigesetzten Arachidonsäure Aussagen über etwaige am Schlüsselenzym angreifende Regulationsmechanismen ermöglicht.

Als Substrat dient ein über ein acylierendes System an der 2-Position mit radioaktiver Arachidonsäure markiertes Phospholipid. Als quantitativ bedeutendste Phospholipid-subklasse wurde hier Phosphatidylcholin gewählt; es konnte gezeigt werden, daß nach säulenchromatographischer Abtren-

nung noch vorhandener freier Arachidonsäure ein Großteil an das Phosphatidylcholin verestert gebunden war, die Wiederfindungsrate nach den einzelnen Reinigungsschnitten mit ca. 60% ermöglichte die Herstellung einer für die weiteren Versuche ausreichenden Substratmenge. Der Versuch der Veresterung anderer hochungesättigter Fettsäuren (z.B. Eikosapentaensäure C20:5 n-3) in beschriebener Weise zeigte, daß die Fettsäure nur in wesentlich geringerer Quantität (ca. 10%) eingebaut wurde. Möglicherweise wird diese Reaktion durch substratspezifische Acyltransferasen katalysiert, die in dem hier verwendeten azylierenden System nicht vorliegen. Es erschien jedoch möglich, daß über Austausch der Fettsäuren oder nicht vorhandene positionelle Spezifität hepatischer Acyltransferasen auch eine Markierung an der 1-Position zustande kam, was zur Verfälschung der Resultate geführt hätte. Eine derartige zusätzliche Markierung war durch die vollständige Hydrolyse des biosynthetisierten Substrates mit hochgereinigter Phospholipase A₂ aus *Crotalus durissimus terrificus* (EC 3.1.1.4.), die selektiv an der 2-Position angreift, auszuschließen.

Ein wichtiges Charakteristikum der membrangebundenen Phospholipase A₂ ist die sowohl in Experimenten mit gereinigtem Enzym als auch in Versuchen mit intakten Zellsystemen beschriebene Abhängigkeit von Calcium als essentiellem Cofaktor. In Versuchen mit einer gereinigten Präparation aus Rindersamenblasen wurde gezeigt, daß ohne Zugabe von exogenem Calcium keine enzymatische Reaktion abläuft (15), gleiches gilt für die hier verwendete Standardphospholipa-

se. Ein signifikanter Anstieg der PLA_2 -Aktivität wurde auch in humanen Thrombozytenmembranen nach Zugabe von Calcium gemessen (52), gleiche Beobachtungen sind an Schaferythrozyten beschrieben (21). Im hier verwendeten Modell der Nierenrindenmikrosomen war jedoch zu beobachten, daß die Zugabe von exogenem Calcium nicht unbedingt erforderlich war. Eine verminderte enzymatische Hydrolyse bis zur vollständigen Hemmung der Reaktion war nur nach Vorinkubation der Mikrosomen mit steigenden Konzentrationen von EDTA nachzuweisen. Dieser Effekt war nach Zugabe von Calcium völlig reversibel, ein Hinweis dafür, daß EDTA wohl nicht direkt mit dem Enzym in Interaktion tritt (66). Es ist wahrscheinlich, daß in Nierenrindenmikrosomen an Membranproteine gebundenes Calcium vorliegt und als Cofaktor dienen kann; mit steigenden EDTA-Konzentrationen wird auch dieser "endogene" Pool blockiert. Eine derartige Schlußfolgerung äußerten auch Erman und Raz (17) bei der Untersuchung der Prostaglandinsynthese in der Medulla der Kaninchenniere, die zeigten, daß nach Substratangebot in Form von freier Arachidonsäure eine Synthesesteigerung mit exogenem Calcium nur in Plasmamembran und Mitochondrien stattfand, nicht aber in Mikrosomen. Die auch von Craven et al. (13) geäußerte Vermutung, daß in Mikrosomen vorhandenes Calcium zur maximalen Stimulation der Phospholipase A_2 ausreicht, war im hier verwendeten Modell der Cortexmikrosomen zu bestätigen. Nach Blockade dieses Cofaktors kann durch Substratangebot in Form von freier Arachidonsäure die Prostaglandinsynthese weiter ablaufen, ein Hin-

weis dafür, daß nur das Schlüsselenzym, die Phospholipase A_2 calciumabhängig ist (17).

Ein weiteres Charakteristikum der Phospholipase A_2 ist die Hemmung mit Mepacrin. Am hier verwendeten System war eine vollständige Supprimierung der Arachidonsäurefreisetzung nach Vorinkubation der Cortextmikrosomen mit 5mM Mepacrin zu beobachten. Es ist bekannt, daß Mepacrin nur die Freisetzung inhibiert, ohne die weitere Konversion zu Prostaglandinen zu beeinflussen (65). Als Mechanismus ist eine direkte Interaktion mit dem Enzym in einem experimentellen System aus Liposomen und Phospholipase A_2 aus *Naja naja* beschrieben (66), am Modell der renomedullären Gewebekultur sahen Zusman et al. eine ca. halbmaximale Inhibierung bei einer Mepacrinkonzentration von 9,2 mM nach entsprechender Vorinkubation. Die Ursache des Konzentrationsunterschiedes dürfte in der besseren Zugänglichkeit des Enzyms für den Inhibitor am System der Mikrosomen liegen.

Unterschiedlich wird in der Literatur die Hemmwirkung von Indomethacin auf die Phospholipase A_2 beurteilt. An Gewebeschnitten der inneren Medulla von Kaninchennieren ist eine signifikante Hemmung der Prostaglandin E_2 -Synthese nach 100uM Indomethacin beschrieben (17), hier wurde eine direkte Hemmung der Phospholipase A_2 vermutet. An humanen Thrombozyten und Leukozyten sind ebenfalls inhibierende Effekte auf die Phospholipase A_2 beobachtet, auffallend sind jedoch deutliche Konzentrationsunterschiede mit einem Bereich von 30-100uM zur halbmaximalen Hemmung (29), wobei in diesen experimentellen Ansätzen die Messung der

Prostaglandine als Parameter diente. Im Gegensatz dazu war am hier verwendeten Modell der Nierenrindenmikrosomen kein Einfluß von Indomethacin bis zu einer Konzentration von 100uM nachweisbar, erst bei 280uM zeigte sich eine geringe Inhibition. Ähnliche Resultate sind von Blackwell et al. an intakten humanen Thrombozyten beschrieben, hier wurde ebenfalls ein experimenteller Ansatz verwendet, der eine isolierte Phospholipase A_2 -Aktivitätsbestimmung ermöglicht (8). Möglicherweise beruht die antiinflammatorische Wirkung von Indomethacin somit weniger auf einer Inhibition der Phospholipase A_2 als vielmehr auf einer Hemmung der Cyclooxygenase, da auch beschrieben wurde, daß in einer Konzentration von 30uM, die ungefähr dem therapeutisch erreichbaren Spiegel entspricht, in vitro dieses Enzym signifikant gehemmt wird (65).

Das Vorkommen von Acyltransferasen ist in mehreren Organsystemen beschrieben worden. Kean und Silver (40) beschrieben in menschlichen Thrombozyten eine membrangebundene Acyl-Co-A:1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholinacyltransferase, die den Einbau von Arachidonsäure und anderer ungesättigter Fettsäuren in Membranphospholipide katalysiert. An intakten Makrophagen zeigten Kröner et al. (31), daß Phospholipase A_2 -Aktivität nicht meßbar war, wenn nicht die Acyltransferaserückreaktion mit Para-Chloromercuribenzoat gehemmt wurde. Auch am Modell der Cortexmikrosomen konnte hier gezeigt werden, daß nach Zugabe von entsprechenden Energiedonatoren ein Einbau von Arachidonsäure in Phospholipide stattfindet. Die Aktivität der renalen

Acyltransferase war jedoch deutlich geringer als in Leberhomogenat, das als acylierendes System zur Substratbiosynthese verwendet wurde. Nach Zugabe von ATP und Coenzym A zum Phospholipase A_2 -Reaktionsansatz war eine deutliche Abnahme der Hydrolyse nachzuweisen; dieser Effekt kommt wahrscheinlich durch eine Aktivierung der Acyltransferase-gegenreaktion zustande, die, wie gezeigt werden konnte, im hier verwendeten Modell ohne Zugabe der Energiedonatoren nicht abläuft. Es ist anzunehmen, daß das Gleichgewicht der Reaktion unter physiologischen Bedingungen ganz auf der Seite der Acyltransferasen liegt, da die durch Phospholipase A_2 -Aktivierung entstehenden Lysophospholipide eine hohe zytotoxische Potenz besitzen (2,73). Die Zugabe von Magnesium, das als essentieller Cofaktor des hepatischen Acyltransferasesystems beschrieben ist (68), war in unserem Modell nicht erforderlich. Wahrscheinlich liegt Magnesium wie auch Calcium in Nierenrindenmikrosomen an Membranproteine gebunden in ausreichender Quantität vor; es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die renale Acyltransferase nicht unbedingt Magnesium benötigt.

Der Einfluß von Steroiden auf die Phospholipase A_2 war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Am Modell der renomedullären Gewebekultur berichten Zusman et al. über die inhibitorische Wirkung von Cortison und Hydrocortison auf die Prostaglandin E_2 -Biosynthese (75). Als Mediator dieses Effektes wird in neuerer Zeit die steroidinduzierte de novo Synthese eines Polypeptides "Lipomodulin"(28) bzw. eines Glykoproteins "Macrocortin"(18) angesehen, die als

Inhibitoren der Phospholipase A_2 wirken und möglicherweise für die antiinflammatorische Wirkung der Steroide mitverantwortlich sind. Lipomodulin wurde nach Dexamethasongabe ex vivo in polymorphkernigen Granulozyten nachgewiesen, Macroscortin ist in der Lunge erstmalig beschrieben. Im hier verwendeten experimentellen System zur Bestimmung der Phospholipase A_2 -Aktivität war ex vivo ein hemmender Effekt von Dexamethason nicht nachzuweisen. Diese Beobachtung korreliert mit den von Vigo et al. publizierten Befunden, die in vitro keinen Einfluß von Steroiden auf die enzymatische Hydrolyse von Dipalmitoyllecithin zeigen konnten (66). Auch an gereinigter Phospholipase A_2 aus humanen Thrombozytenmembranen ließ sich kein hemmender Effekt von Hydrocortison nachweisen (20). Die Ursache dieser differenten Untersuchungsergebnisse ist möglicherweise darin zu sehen, daß zum Nachweis der inhibierenden Steroidwirkung ein physiologisch intakter Zellverband mit zytosolisch vorliegenden Glukocorticoidrezeptoren erforderlich ist (24,48), was bei den erwähnten gereinigten Enzympräparaten nicht der Fall ist. Auch am unsererseits untersuchten Mikrosomenmodell bleiben denkbare Wirkungen zytosolischer Mediatoren unberücksichtigt. Möglicherweise wird auch eine in vivo vorhandene und wirksame Mediator-Enzym-Koppelung durch mechanische Alteration während der Mikrosomenpräparation gestört. Ein direkter inhibitorischer Einfluß von Steroiden auf die renocorticale Phospholipase A_2 erscheint jedoch weniger wahrscheinlich, wie auch von Russo-Marie et al angenommen wird (57).

Wie eingangs erwähnt bestehen enge Beziehungen zwischen der renalen Prostaglandinsynthese und anderen an der Regulation des Kochsalz- und Wasserhaushaltes beteiligten Systemen. Ein direkter hemmender Einfluß einer hohen Kochsalzbelastung war am hier verwendeten Modell der renocorticalen Phospholipase A_2 nicht nachzuweisen; die Prostaglandin E_2 -Ausscheidung im Urin sank jedoch signifikant ab. Ein derartiger Abfall der Prostaglandin E_2 -Exkretion ist auch in anderen Tierexperimenten wie auch am Menschen beschrieben (62). Als Ursache dieses scheinbar diskrepanten Befundes kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Die Verwendung von isolierten Nierenrindenmikrosomen als Enzymquelle erfaßt nicht eine denkbare Beeinflußung der Aktivität durch cytosolische Faktoren. Eine Zugabe von cytosolischer Fraktion ist jedoch insofern problematisch, da anzunehmen ist, daß Energiedonatoren wie ATP und Coenzym A als niedermolekulare Verbindungen in dieser Fraktion vorliegen und zu einer Aktivierung des membrangebundenen Acyltransferasesystems führen könnten, was eine Beurteilung der Phospholipase A_2 -Aktivität durch gleichzeitige Reacylierung freier Arachidonsäure unmöglich machen würde. Hier könnte ein hochselektiver Inhibitor der renalen Acyltransferase weitere Untersuchungen ermöglichen, eine derartige Substanz ist jedoch derzeit nicht bekannt.

Eine weitere Ursache besteht möglicherweise in der präparationsbedingten mechanischen Alteration, da gezeigt werden konnte, daß die Phospholipase A_2 durch mechanische Manipulation maximal stimulierbar ist (38). Bei sorgfälti-

ger Einhaltung der beschriebenen Präparationsbedingungen scheint eine solche Aktivierung jedoch weniger wahrscheinlich.

Es ist auch denkbar, daß eine durch Kochsalzbelastung suppressierte Phospholipase A_2 -Aktivität in erster Linie im Nierenmark zum Tragen kommt. Die unlängst publizierten Resultate von Stahl et al.(61), die im Cortextgewebe keine Veränderungen der Prostaglandin E_2 -Synthese unter wechselnder Kochsalzbelastung nachweisen konnten, sind jedoch unter der Einschränkung zu betrachten, daß hier der Gehalt an metabolisierenden Enzymen sehr hoch ist, sodaß eine isolierte Prostaglandin E_2 -Messung keine Aussagen über die tatsächliche Synthesekapazität dieses Gewebes liefert (49). Die Untersuchungen von Weber et al.(72), die nach Kochsalzbelastung neben einer weitgehend unveränderten Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Ausscheidung eine deutlich reduzierte Prostaglandin E_2 -Menge im Urin beschrieben, deuten darauf hin, daß auch später eingreifende Mechanismen, die die absolute Menge an Prostaglandinen unbeeinflußt lassen, jedoch das Spektrum durch Aktivierung des metabolisierenden Enzymsystems verändern, an den Regulationsvorgängen beteiligt sein könnten. In dieser Arbeit wird über eine Stimulation der corticalen 9-Ketoreductase, die Prostaglandin E_2 in Prostaglandin $F_{2\alpha}$ metabolisiert, berichtet. Im Kontext dieser Befunde mit den hier berichteten Resultaten erscheint eine direkte Beeinflussung der renalen Phospholipase A_2 durch Kochsalzbelastung eher unwahrscheinlich, eine letztlich exakte Klärung muß jedoch Ziel

weiterer Untersuchungen bleiben. Es kann zusammenfassend gesagt werden, daß die hier beschriebene Methode Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der Phospholipase A₂ ermöglicht; eine genauere Charakterisierung der an der Phospholipiddeacylierung beteiligten stimulierenden oder inhibierenden Mechanismen ist mit dieser Technik auch in anderen Modellen, z.B. an polymorphkernig Granulozyten oder an Zellen des Gefäßendothels, denkbar.

VI. Zusammenfassung

Die membrangebundene Phospholipase A_2 wird als Schlüsselenzym der Prostaglandin- und Leukotrienbiosynthese angesehen. Sie spaltet spezifisch die an der 2-Position zellulärer Phospholipide verestert gebundenen Präkursorfettsäuren für die weitere Metabolisierung via Cyclooxygenase - Prostaglandinsynthetasekomplex oder Lipoxygenase-Leukotriensynthetasekomplex ab, limitiert somit das Substratangebot. Aussagen zur Aktivität dieses Enzyms wurden bisher meistens durch die quantitative Analyse der Endprodukte des gesamten Stoffwechselweges, in der Niere durch die Messung der einzelnen Prostaglandinsubklassen, erzielt. Mechanismen, die im späteren Verlauf der enzymatischen Reaktionsfolge interferieren, bleiben somit unberücksichtigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer Methode zur radiochemischen Aktivitätsbestimmung mikrosomaler Phospholipase A_2 .

Als Substrat wurde ein an der 2-Position mit radioaktiver Arachidonsäure markiertes Phosphatidylcholin biosynthetisiert; es wurde eine enzymatische Reaktion mit hepatischen Acyltransferasen unter Zugabe von ATP/Coenzym A als Energiedonatoren verwendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte durch enzymatische Hydrolyse mit hochgereinigter Standardphospholipase A_2 (EC 3.1.1.4.) die selektive Markierung an der 2-Position gezeigt werden. Nach Herstellung einer ausreichenden Menge dieses Substrats war die Aktivität der renal-corticalen Phospholi-

pase A_2 aus Mikrosomen der Kaninchenniere zu untersuchen. Die enzymatische Aktivität dieses Enzyms war durch Mepacrin zu inhibieren, Indomethacin zeigte hingegen in therapeutisch erreichbaren Konzentrationen keinen hemmenden Effekt. Es ist anzunehmen, daß diese Substanz in vivo weniger an der Phospholipase A_2 als vielmehr an der Cyclooxygenase und am nachgeschalteten Enzymkomplex angreift; die enzymatische Freisetzung der Präkursorfettsäure wird nach unseren Resultaten nicht beeinflußt.

Die Abhängigkeit der Reaktion von Calcium als Cofaktor konnte am hier verwendeten Modell nachgewiesen werden; es ließ sich zeigen, daß Nierencortexmikrosomen einen zur Aktivierung membrangebundener Phospholipase A_2 ausreichender Pool an Calcium besitzen, der erst durch Zugabe von EDTA blockiert werden muß, um die enzymatische Hydrolyse vollständig zu blockieren. Dieser Effekt ist durch Zugabe von exogenem Calcium vollständig reversibel und beruht somit wahrscheinlich nicht auf einer direkten Interaktion des Chelatbildners mit dem Enzym.

Eine Verfälschung der am hier verwendeten Modell beschriebenen Resultate durch die Aktivierung renaler Acyltransferasen war auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, daß Nierencortexmikrosomen Acyltransferaseaktivität besitzen; die Reacylierung freier Fettsäuren erfordert jedoch das Vorliegen von Energiedonatoren und spielt somit in unserem System keine Rolle. Unter physiologischen Bedingungen liegt das Gleichgewicht der Reaktion wahrscheinlich ganz auf der Seite des in der Literatur als weitgehend unspezi-

fisch beschriebenen Acyltransferasesystems, um die Akkumulation von Lysophospholipiden mit hoher zytotoxischer Potenz zu verhindern.

Kontrovers wird derzeit der Einfluß von Glukokortikoiden auf die Phospholipase A_2 diskutiert. Während in intakten Zellverbänden unter Steroideinfluß ein neusynthetisiertes Protein beschrieben wurde, das durch Inhibition der Phospholipase A_2 möglicherweise für die antiinflammatorische Wirkung mitverantwortlich ist, fanden andere experimentelle Ansätze keinen hemmenden Effekt. Im hier verwendeten System mikrosomaler Phospholipase A_2 war ex vivo keine Inhibierung nachzuweisen, wobei einschränkend zu beachten ist, daß mögliche Effekte zytosolischer Mediatoren am Mikrosomenmodell unberücksichtigt bleiben. Eine hemmende Wirkung durch Direktinteraktion Glukokortikoid - membran-gebundenes Enzym erscheint nach den hier vorliegenden Resultaten im Kontext mit Angaben aus der Literatur eher weniger wahrscheinlich.

Eine Beeinflussung der renalen Phospholipase A_2 durch Kochsalzbelastung erscheint aufgrund der Bedeutung der renalen Prostaglandine für die Kochsalz- und Wasserhomöostase denkbar. Am hier untersuchten System konnte keine signifikante Aktivitätsabnahme der mikrosomalen Phospholipase A_2 nachgewiesen werden. Zu diskutieren sind in erster Linie Faktoren, die im Mikrosomenmodell nicht erfaßt werden. Möglich ist auch, daß unter Kochsalzbelastung weniger die Aktivität des Schlüsselenzyms als vielmehr die Kapazität des metabolisierenden Enzymkomplexes variiert

wird; die unter Kochsalzbelastung gesteigerte Aktivität der 9-Keto-reduktase, die PGE_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ umwandelt, ist als Hinweis in dieser Richtung zu werten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit der hier beschriebenen Methode spezifische Aussagen über die Aktivität der Phospholipase A_2 gemacht werden können, ebenso ist die Untersuchung von hier angreifenden Regulationsmechanismen möglich. Eine weitere Charakterisierung der an der Deacylierung und Reacylierung von Phospholipiden beteiligten Enzymsysteme erscheint auch in anderen zellulären Elementen durchführbar.

VII Literaturverzeichnis

- 1) Alexander, R.W., Gimbrone, M.A.: Stimulation of prostaglandin E_2 synthesis in cultured human umbilical vein smooth muscle cells. Proc.Natl.Acad.Sci. 73: 1617-1621 (1976)
- 2) Arnsdorf, M.F., Sawicki, G.J.: The effects of Lysophosphatidylcholin, a Toxic Metabolite of Ischaemia, on the Components of Cardiac Excitability in Sheep Purkinje Fibers. Circulation Res. 49/1: 16-30 (1981)
- 3) Bailey, M.O., Crosslan, K., Hook, J.B.: Natriuretic effects of furosemide after inhibition of prostaglandin synthesis. J.Pharm.Exp.Therap. 199: 469-476 (1976)
- 4) Bell, R.L., Kennerly, D.A., Stanford, U., Majerus, P.W.: Diglyceride lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets. Proc.Natl.Acad.Sci. 76: 3238-3241 (1979)
- 5) Berglund, G.: Should salt intake be cut down to prevent primary hypertension? Acta med.Scand. 207: 241-256 (1981)
- 6) Billah, M.M., Lapetina, E., Cuatrecasas, P.: Phospholipase A_2 and Phospholipase C Activities in Platelets: Differential Substrate Specificity, Ca^{2+} -Requirement, pH-Dependence and cellular localisation. J.Biol.Chem. 250: 9342-9357 (1981)
- 7) Bills, T.K., Smith, J.B., Silver, M.J.: Metabolism of ^{14}C -Arachidonic acid by human platelets. Biochim.Biophys.Acta 424: 303-312 (1976)
- 8) Blackwell, G.J., Duncombe, W.G., Flower, R.J., Parsons, M.F., Vane, J.R.: The Distribution and Metabolism of Arachidonic acid in Rabbit Platelets during Aggregation and its Modification by Drugs. British J.Pharmacol. 59: 353-366 (1977)

- 9) Bosch, H.v.: Intracellular Phospholipases A. *Biochim.Biophys.Acta* 604: 191-246 (1980)
- 10) Bosch, H.v., Aarsman, A.J.: A Review on Methods of Phospholipase A Determination. *Agents and Actions* 9/4: 18-25 (1979)
- 11) Chaumet-Riffaud, P., Oudinet, J.P., Sraer, J., Lajotte, Ch., Ardailhou, R.: Altered PGE₂ and PGF₂ production by glomeruli and papilla of sodium-depleted and sodium-loaded rats. *Am.J.Physiol.* 241: F517-524 (1981)
- 12) Cook, H.W., Lands, W.E.M.: Mechanism for suppression of cellular biosynthesis of prostaglandins. *Nature* 260: 630-635 (1976)
- 13) Craven, P.A., Briggs, R., DeRubertis, F.: Calcium-dependent Action of Osmolality on Adenosine 3',5'-Monophosphate Accumulation in Rat Renal Inner Medulla. *Biochim. Biophys.Acta* 144: 605-612 (1981)
- 14) Dunn, M.J., Hood, V.L.: Prostaglandins and the kidney. *Am.J.Physiol.* 233F: 169-187 (1977)
- 15) Durivier, J., Wolf, D., Heusghen, C.: Enzymatic properties of prostaglandin synthetase from bovine seminal vesicles. *Biochimie* 57: 521-528 (1975)
- 16) Egan, R.W., Paxton, H.O., Kuehl, F.A.Jr.: Mechanism for irreversible self-deactivation of prostaglandin synthetase. *J.Biol.Chem.* 251: 7329-7334 (1976)
- 17) Erman, A., Raz, A.: Prostaglandin biosynthesis and lipolysis in subcellular fractions from rabbit kidney medulla. *Biochem.J.* 194: 957-961 (1981)

- 18) Flower, R.J., Blackwell, G.J.: Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A_2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278: 456-459 (1979)
- 19) Flower, R.J., Blackwell, G.J.: The importance of PLA_2 in prostaglandin biosynthesis. *Biochem.Pharmacol.* 25: 285-291 (1976)
- 20) Franson, R.C., Eisen, D., Jesse, R., Lanni, C.: Inhibition of High purified Mammalian Phospholipase A_2 by Non-Steroidal Antiinflammatory Agents. *Biochem.J.* 186: 633-636 (1980)
- 21) Frei, E., Zahler, P.: Phospholipase A_2 from sheep erythrocyte Membranes. Calcium-dependence and Localisation. *Biochim.Biophys.Acta* 550: 450-463 (1979)
- 22) Freis, E.D.: Salt, volume and the prevention of hypertension. *Circulation* 53: 383-395 (1976)
- 23) Gimbrone, M.A., Alexander, R.W.: Angotensin II Stimulation of Prostaglandin Production in Cultured Human Vascular Endothelium. *Science* 189: 219-220 (1975)
- 24) Grandics, P., Miller, A., Litwack, G.: Purification of the unactivated Glucocorticoid Receptor and its subsequent in Vitro Activation. *J.Biol.Chem.* 259/5: 3173-3180 (1984)
- 25) Gross, F., Brunner, H., Ziegler, M.: Renin-Angiotensin-Aldosterone-System and sodium balance. Recent progress *Hormone Research* 21: 119-123 (1965)
- 26) Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.: Thromboxanes, a new group of biologically active compounds derived from PG-Endoperoxides. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 72: 2994-2998 (1975)

- 27) Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., Samuelsson, B.: Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 71: 345-352 (1974)
- 28) Hirata, F., Axelrodt, J.: A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 77/5: 2533-2536 (1980)
- 29) Kaplan, L., Weiss, J., Elsbach, P.: Low concentrations of indomethacin inhibit phospholipase A₂ of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 75/6: 2955-2958 (1978)
- 30) Kawasaki, T., Delea, C.C., Bartter, F.C., Smith, H.: The effect of high sodium and low sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension. *Am.J.Med.* 64: 193-205 (1978)
- 31) Kröner, E.E., Peskar, H.A., Fischer, H., Ferber, E.: Control of Arachidonic acid Accumulation in Bone Marrow-derived Macrophages by Acyltransferases. *J.Biol.Chem.* 256/8: 3690-3697 (1981)
- 32) Kunze, H., Vogt, W.: Significance of Phospholipase A for PG-Formation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 180: 123-131 (1971)
- 33) Larsson, C., Änggård, E.: Regional differences in the formation and metabolism of prostaglandins in rabbit kidney. *Europ.J.Pharmacol.* 21: 30-41 (1973)
- 34) Levenson, D.J., Simmons, Ch.E., Brenner, B.M.: Arachidonic acid metabolism, prostaglandins and the kidney. *Am.J.Med.* 72: 213-228 (1982)
- 35) Lever, A.F., Beretta-Piccoli, C., Brown, J.J., Davies, D.L., Fraser, R., Robertson, J.J.S.: Sodium and Potassium in essential hypertension. *Brit.med.J.* 283: 1-20 (1981)

- 36) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- 37) Luft, F.C., Weinberger, M.H.: Sodium Intake and essential hypertension. *Hypertension, Suppl. III, Vol.4/5*: 62-71 (1982)
- 38) Lumb, R.H., Allen, K.F.: Properties of Microsomal Phospholipases in Rat Spleen and Liver. *Biochim.Biophys.Acta* 450: 175-184 (1976)
- 39) Mc Giff, J.C., Malik, K.U., Teragno, W.O.: Prostaglandins as determinants of vascular reactivity. *Fed.Proc.* 35: 2382-2387 (1974)
- 40) Mc Kean, M.L., Smith, J.B., Silver, M.J.: Phospholipid Biosynthesis in Human Platelets. *J.Biol.Chem.* 257/19: 11278- 11283 (1982)
- 41) Mendlowitz, M.: Some theories of hypertension. Fact and fancy. *Hypertension* 1: 435-441 (1979)
- 42) Miall, W.E., Heneage, P., Koshla, T., Lovell, H.G., Moore, F.: Factors in influencing the degree of resemblance in arterial pressure of dose relatives. *Clin.Sci.* 33: 271-283 (1967)
- 43) Miall, W.E., Oldham, P.P.: The hereditary factor in arterial blood pressure. *Brit.med.J.* I/75 (1963)
- 44) Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, V., Vane, J.R.: An enzyme isolated from arteries transforms PG-Endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665 (1976)

- 45) Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., Vane, J.R.: Differential formation of prostacyclin by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Tromb.Res.* 11: 323-331 (1977)
- 46) Morrison, A.R., Needleman, A.: *Biochemistry and pharmacology of renal prostaglandins. Hormonal function and the kidney*, N.Y., Churchill Livingstone Inc., 66-88 (1979)
- 47) Needleman, P.: The synthesis and function of prostaglandins in the heart. *Fed.Proc.* 35: 2376-2381 (1976)
- 48) Oikarinen, J., Härmäläinen, L., Oikarinen, A.: Modulation of Glucocorticoid Receptor Activity by Cyclic Nucleotides. *Biochim.Biophys.Acta* 799: 158-165 (1984)
- 49) Oliv, E.: Prostaglandins and the kidney function. *Acta Phys.Scand.*, Suppl. 461 (1979)
- 50) Patak, R.V., Mookerjee, B.K., Beutzel, C.J., Hysert, P.E., Babeu, M., Lee, J.B.: Antagonism of the effects of furosemide by indomethacin in normal and hypertensive man. *Prostaglandins* 10: 649-659 (1975)
- 51) Pettersen, E.B.: Effect of Sodium Loading and Exercise on Renal Haemodynamics and Urinary Sodium Excretion in Young Patients with Essential Hypertension before and during Propanolol Treatment. *Acta med.Scand.* 201: 365-373 (1977)
- 52) Pickett, W.C., Jesse, R.L., Cohen, P.: Initiation of PLA₂ Activity in human platelets by the Ca^{2+} ionophore A 23187. *Biochim.Biophys.Acta* 486: 209-213 (1977)
- 53) Pickering, G.W.: *High Blood Pressure*. Grune + Stratton, N.Y. (1968)

- 54) Pickering, G.W.: Salt intake and essential hypertension. Cardiovascular Reviews and Reports I/13 (1980)
- 55) Rathaus, M., Podjarry, E., Weiss, E., Ravid, M., Baumin-ger, S., Bernheim, J.: Effect of chronic and acute changes in sodium balance on the urinary excretion of Prosta-glandines E_2 and F_2 in normal men. Clin.Sci. 60: 405-410 (1981)
- 56) Rillema, J.A., Osmialowski, E.C., Linebaugh, B.E.: Phos-pholipase A_2 Activity in 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthra-cene-induced mammary Tumors of Rats. Biochim.Biophys.Acta 617: 150-155 (1980)
- 57) Russo-Marie, F., Duval, O.: Dexamethason-induced inhibi-tion of Prostaglandin Production does not Result from a direct Action on Phospholipase Activities but is mediated through a steroid inducible factor. Biochim.Biophys.Acta 717: 177-185 (1982)
- 58) Scherer, B., Schnermann, J., Sofroniev, M., Weber, P.C.: PG-analysis in urine of humans and rats by different ra-dioimmunoassays: Effect of PG-synthetase - inhibitors, laparatomy and furosemide. Prostaglandins 15: 255-262 (1978)
- 59) Scherer, B., Siess, W., Weber, P.C.: Decrease of PGE_2 excretion at high NaCl-intake in rabbit urine. Prosta-glandins 13: 1127-1136 (1977)
- 60) Smith, W.L., Wilkin, G.P.: Immunochemistry of prostaglan-din endoperoxide-forming cyclooxygenases. The detection of the cyclooxygenases in rat, rabbit and guinea pig kid-neys by immunofluorescence. Prostaglandins 13: 873-879 (1979)

- 61) Stahl, R.A.K., Attallah, A.A., Bloch, D.L., Lee, J.B.: Stimulation of Rabbit renal PGE_2 biosynthesis by dietary Sodium restriction. *Am.J.Physiol.* 237: F344-349 (1979)
- 62) Stahl, R.A.K., Jonassen, A.J., Paravicini, M., Schollmeyer, P.: Sodium Chloride as Regulator of Renal Prostaglandin E_2 Production in Patients with Essential Hypertension. *Kli.Wo.* 60: 579-581 (1982)
- 63) Staszewska-Barczack, J., Vane, J.R.: The role of prostaglandins in the local control of circulation. *Clin.Exp. Pharmacol.Physiol.*, Suppl. 2:71-78 (1975)
- 64) Tobian, L., O'Donnel, M.: Renal prostaglandins in relation to sodium regulation and hypertension. *Fed.Proc.* 35: 2388-2392 (1976)
- 65) Vane, J.R.: Inhibitors of Prostaglandin, Prostacyclin and Thromboxane Synthesis. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research.* Raven Press N.Y. 4: 27-40 (1978)
- 66) Vigo, C., Lewis, G.B., Piper, P.J.: Mechanism of Inhibition of Phospholipase A_2 . *Biochem.Pharmacol.* 29: 623-627 (1980)
- 67) Vogt, W.: Role of Phospholipase A_2 in PG-Formation. *Advance in Prostaglandine and Thromboxane*, Res.Vol. 3: 89-96, N.Y. Raven Press (1978)
- 68) Waite, M., van Deenem, L.L.M.: Hydrolysis of Phospholipids and Glycerides by Rat-Liver Preparations. *Biochim. Biophys.Acta* 137: 498-517 (1981)
- 69) Weber, P.C., Larsson, C., Hamberg, M., Änggard, E., Corey, E.J., Nicolaou, K.C., Samuelsson, B.: Stimulation of renin release from rabbit renal cortex by arachidonic acid and prostaglandin endoperoxides. *Circulation Research* 39: 868-872 (1976)

- 70) Weber, P.C., Larsson, C., Hamberg, M., Änggård, E., Corey, E.J., Samuelsson, B.: Effects of stimulation and inhibition of the renal prostaglandin synthetase system on renin release in vivo and in vitro. Clin.Sci.Mol.Med. 51: 271-276 (1976)
- 71) Weber, P.C., Scherer, B., Larsson, C.: Increase of free arachidonic acid by furosemide in man as the cause of prostaglandin and renin release. Europ.J.Pharmacol. 41: 329-335 (1972)
- 72) Weber, P.C., Larsson, C., Scherer, B.: Prostaglandin E -9-~~K~~eto-reductase as a mediator of salt intake related to prostaglandin-renin-interaction. Nature 266: 65-66 (1977)
- 73) Weltzien, H.H.: Cytolytic and Membrane perturbing Properties of Lysohospholipids. Biochim.Biophys.Acta 559: 259-287 (1981)
- 74) Wong, P.Y., Talamo, R.C., Williams, G.H., Colman, R.W.: Response of the Kallikrein-Kinin and Renin-Angiotensin-Systems to Saline Infusion and Upright Pressure. J.Clin. Invest. 55: 691-698 (1975)
- 75) Zusmann, R.M., Keiser, H.R.: Prostaglandin E₂ biosynthesis by rabbit renomedullary interstitial cells in tissue culture. Mechanism of stimulation by angiotensin II, bradykinin and arginine vasopressin. J.Biol.Chem. 252: 2069-2076 (1977)

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. P. C. Weber für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. W. Siess für sein Interesse und anregende Diskussion.

Herrn Professor Dr. E. Buchborn ist zu danken für die Arbeitsmöglichkeiten innerhalb der Medizinischen Klinik.

Lebenslauf

Am 15.1.1955 wurde ich als Sohn von Georg Strasser, kommunaler Wahlbeamter, und seiner Ehefrau Elfriede Strasser, geb. Martin., in Ottobeuren, Kreis Unterallgäu, geboren.

Nach Besuch der Volksschule wurde die allgemeine Hochschulreife am Bernhard - Strigel - Gymnasium in Memmingen erworben. Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München und bekam 1982 die Approbation erteilt.

Seit 1983 arbeite ich als wissenschaftliche Assistent an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

